



بررسی فنوتیپی و مولکولی تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) بین سویه-های /شریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی در همدان

هادی حسین پور^۱، حمید معتمدی^۱، علی محمدی بردبری^۲، رسول یوسفی مشعوف^{۱*}

۱- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۹

*نویسنده مسئول: رسول یوسفی
مشعوف، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
تلفن:
پست الکترونیک:

Yousefimash@gmail.com

چکیده

مقدمه

یکی از دلایل بروز مقاومت دارویی در ایزوله‌های /شریشیاکلی تولید آنزیم‌های وسیع الطیف می‌باشد. استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت کشاورزی و دامپروری، افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به همراه داشته است. لذا هدف از این پژوهش، بررسی فنوتیپی و مولکولی تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) در بین سویه‌های /شریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت توصیفی-مقطعی بر روی ۹۳ ایزوله /شریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی و ماکیان شهر همدان در سال ۱۳۹۶ انجام گرفت. سپس بررسی حساسیت میکروبی ایزوله‌های مولد بتالاکتاماز با استفاده از روش دیسک ترکیبی (Combined test, CT) و بر اساس دستورالعمل (۲۰۱۵) تعیین شد. همچنین، شناسایی مولکولی ژن‌های تولید کننده ESBLs (*blaTEM-1* و *blaCTX-1*، *blaSHV*) با استفاده از روش PCR صورت گرفت.

یافته‌ها

ارزایی الگوی حساسیت میکروبی نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به نالیدیکسیک اسید (۸۸/۴ درصد)، آمپی سیلین (۷۶/۸ درصد)، تتراسایکلین (۸۲/۸ درصد) و سولفومتاکسازول (۶۷/۰ درصد) مشاهده شد. در این مطالعه مقاومت نسبت به سفنازیدیم، سفوکسیتین، آزرونام، سفوتاکسیم مشاهده نشد. بررسی ژنوتیپی با استفاده از روش PCR نشان داد که میزان فراوانی ژن‌های *blaTEM-1* و *blaCTX-1*، *blaSHV* در ایزوله‌های /شریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی به ترتیب ۵/۳۷، ۱۹/۳۵ و ۲۹/۰۳ درصد می‌باشد.

نتیجه‌گیری

ایزوله‌های /شریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی مقاومت نسبتاً بالایی نسبت به آنتی-بیوتیک‌های نظیر آمپی سیلین، سولفومتاکسازول و تتراسایکلین از خود نشان دادند. از سویی دیگر تکنیک PCR در مقایسه با روش کشت از حساسیت بالاتری برخوردار می‌باشد.

کلیدواژه‌ها

/شریشیاکلی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)، PCR



مقدمه

اشریشیاکلی به عنوان یکی از مهمترین پارامترهای آلودگی مواد غذایی، آب و مواد مدفوعی شناخته شده است (۱، ۲). مقاومت در برابر این پاتوژن در جدایه‌های بالینی و مواد غذایی افزایش یافته است. به گونه‌ای که در سال‌های اخیر مقاومت چند دارویی شامل طیف گسترده ESBL در غذاهای گیاهی که از طریق زنجیره غذایی به انسان منتقل می‌شوند، شناسایی شده است (۳). علیرغم افزایش نگرانی‌های بهداشت عمومی، میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها برای استفاده در حیواناتی که برای تولید مواد غذایی توزیع شده در سال‌های ۲۰۰۹-۲۰۱۵ مورد بررسی قرار گرفتند، به طور چشمگیری افزایش یافته است (۴، ۵).

استراتژی‌های مختلفی توسط باکتری‌ها بکار گرفته می‌شود تا از اثرات زیانبار آنتی‌بیوتیک‌ها مصون بمانند، یکی از این مکانیسم‌ها که در باکتری‌های گرم منفی علیه آنتی‌بیوتیک‌ها به کار گرفته شده است تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی -Beta (Lactamase enzymes) می‌باشد (۶). این آنزیم‌ها از طریق هیدرولیز حلقه بتالاکتام منجر به ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردند. بتالاکتامازهای وسیع الطیف به طور غالب در گونه‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه مشاهده می‌شوند. الگوهای مختلفی برای طبقه‌بندی بتالاکتامازها وجود دارد. یکی از این روش‌ها که عمدتاً از آن استفاده می‌شود، به وسیله بوش^۱، جاکوبی^۲ و مدیویوس^۳ ابداع شده است که بر اساس نوع سوپسترا، ممانعت‌کنندگی و خصوصیات فیزیکی نظیر وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک بتا لاکتامازها، به چهار گروه یا چهار

کلاس اصلی (A, B, C, D) طبقه‌بندی می‌شوند. بر اساس این طبقه‌بندی، آنزیم‌های CTX-M، TEM و SHV در کلاس A قرار دارند (۷، ۸).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ در هلند روی طیف گسترده ESBL در اشریشیاکلی بر روی گوشت مرغ صورت گرفت، پی بردند که شیوع ژن‌های ESBL در گوشت مرغ ۷۹/۸ درصد بوده است که این می‌تواند حاکی از این باشد که حضور فراوان از ژن‌های ESBL در زنجیره مواد غذایی ممکن است تاثیر عمیقی بر آینده گزینه‌های درمانی برای طیف گسترده‌ای از عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی داشته باشد (۹). مقاومت دارویی در حیوانات عمدتاً توسط مقدار زیادی از داروهای ضد میکروبی مورد استفاده در تولید مواد غذایی ایجاد می‌شود.

علاوه بر حضور آنها در حیوانات مزرعه، ژن‌های ESBL در مرغ‌های موجود در مغازه‌های گوشت فروشی یافت شده است (۱۰، ۱۱). اپیدمیولوژی ESBLs، منطقه جغرافیایی و همچنین کشوری که در آن طیف گسترده بتالاکتاماز وجود دارد، بسیار پیچیده است علاوه بر این مخازن متعددی از جمله عوامل زیست محیطی (به عنوان مثال: آب و خاک)، حیوانات وحشی، حیوانات مزرعه و حیوانات خانگی که در آنها وجود باکتری‌های اشریشیاکلی با درصد اندمیک بیشتر یافت شده است. در نهایت، حضور این باکتری ممکن است به دلیل انتقال از طریق مواد غذایی، آب و از طریق تماس مستقیم یا غیر مستقیم (فرد به فرد) رخ دهد (۱۲، ۱۳). بررسی‌های اخیر از جوجه‌های گوشتی در بریتانیا نشان داده شده است که ژن *bla_{CTX}* از ESBLs شایع‌ترین نوع از ژن-های مورد نظر بوده است. (۱۴، ۱۵). به طور کلی مطالعات و گزارش‌های متعددی حاکی از شیوع پراکنش این نوع

^۱Bush
^۲Jacoby
^۳Medevios



الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های جدا شده به روش استاندارد دیسک (۲۰۱۵) (Clinical and laboratory standard institute) دیفیوژن انجام شد و آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شامل دیسک‌های سفنازیدیم (۳۰ µg)، ایمی پنم (۱۰ µg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg)، آرترونام (۳۰ µg)، آمپی سیلین (۱۰ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg)، جنتامیسین (۱۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)، سفوکسیتین (۳۰ µg)، مینوسایکلین (۳۰ µg) و آموکسی سیلین (۲۵ µg) (MAST انگلستان) بودند (۱۶).

شناسایی بتالاکتام‌های وسیع الطیف (ESBLs)

سویه‌های مقاوم یا حدواسط به سفوتاکسیم و سفنازیدیم برای غربالگری سویه‌های تولید کننده ESBLs انتخاب می‌شوند. در مرحله بعد با استفاده از آزمایش دیسک ترکیبی (Combined test, CT) و روش پیشنهادی NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) و همچنین استفاده از دیسک‌های سفنازیدیم در کنار سفوتاکسیم/کلانات و سفوتاکسیم در کنار سفوتاکسیم/کلانات سویه تولید کننده ESBLs انجام شد. سویه‌هایی که تفاوت قطر هاله عدم رشد آنها بیشتر از ۵ میلی‌متر در یک آنتی‌بیوتیک در مقایسه با همان آنتی‌بیوتیک حاوی کلانولیک اسید بود به عنوان تولید کننده ESBLs در نظر گرفته شد.

استخراج DNA ژنومی

برای انجام استخراج DNA ژنومی مراحل اولیه به صورت زیر انجام شد. ابتدا از جدایه‌های بالینی تأیید شده با آزمایش‌های بیوشیمیایی، ذخیره شده در ۲۰- درجه سلسیوس، محیط Blood agar (Merck آلمان) با ۵ درصد خون گوسفند، ساب کالچر داده شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس یک کلنی از هر ایزوله کشت داده شده به ۵ میلی لیتر محیط کشت

مقاومت در اقصی نقاط دنیا بوده و این ماحصل یک مشکل جهانی است. لذا هدف از این مطالعه، بررسی شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی و نیز ژن‌های مولد بتالاکتام‌های وسیع الطیف (*blaTEM-1*, *blaCTX-1*, *blaSHV*) در اشریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی می‌باشد. تا با شناسایی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و گزارش آن به مراجع ذیربط گامی موثر در سلامت و بهداشت جامعه برداشته شود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت توصیفی-مقطعی بر روی ۹۳ ایزوله اشریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی و ماکیان شهر همدان در سال ۱۳۹۶ انجام گرفت. در این مطالعه، طی یک دوره ۶ ماهه نمونه‌های مواد غذایی شامل (گوشت قرمز، سوسیس، کالباس، شیرخام، گوشت مرغ و پنیر) از مغازه‌های عمده فروشی و سوپر مارکت‌های شهر همدان جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده داخل میکروتیوب‌های پلاستیکی درب دار که حاوی محیط ترانسپورت (BHI Brain Heart Infusion broth) با ۱۰ درصد گلیسرول بود، تلقیح و برای انجام آزمایشات تکمیلی و تشخیصی دقیق‌تر به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل گردید.

جداسازی و شناسایی باکتری

ایزوله‌های بدست آمده بر روی محیط (Merck) Blood Agar (آلمان) و محیط EMB بصورت خطی کشت داده شدند و بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. کلونی‌های جدا شده با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی مانند (کاتالاز، TSI، SIM، VP، MR، سیمون سترات و اوره) در آزمایشگاه گروه میکروب شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت ۹۳ ایزوله اشریشیاکلی بعد از انجام آزمایشات افتراقی شناسایی شد.

تست تعیین حساسیت دارویی

تعیین ژن‌های (*bla_{TEM-1}*, *bla_{CTX-1}*, *bla_{SHV}*) با روش

PCR

پرایمرهای تهیه شده از شرکت سیناکلون برای شناسایی ژن‌های *bla_{TEM-1}*, *bla_{CTX-1}* و *bla_{SHV}* مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل محلول ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix (سیناکلون، تهران)، ۳ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر بود. آب مقطر دیونیزه جهت تنظیم حجم در ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. در این مطالعه از پرایمرهای زیر جهت بررسی‌های مولکولی استفاده شد.

لوریا برتانی براث (شرکت Merck آلمان) که قبلاً درون لوله‌های درب دار شیشه‌ای به تعداد ایزوله‌ها تقسیم و شماره‌گذاری شده بودند، تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ساعت انکوبه گردید. ۱/۵ سی سی از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب‌های درب دار ۱/۵ پلاستیکی تلقیح شده و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت سینا ژن بر اساس پرتکل شرکت سازنده انجام شد. DNA بدست آمده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس برای انجام آزمون‌های مولکولی، ذخیره شد.

جدول ۱- توالی اولیگونوکلوئوتیدی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده PCR

ژن‌های مورد نظر	توالی پرایمر	اندازه (bp)	رفرنس
<i>bla_{TEM-1}</i>	AGATCAGTTGGGTGCACGAG TGC TTAATCAGTGAG GCACC	۷۵۰	(۱۷)
<i>bla_{SHV}</i>	TCAGCGAAAAACACCTTG CCCGCAGATAAATCACCA	۴۷۱	(۱۸)
<i>bla_{CTX-1}</i>	GACGAT GTCAC TGC TGAGC AGC CGCCGACGCTAATACA	۴۹۹	(۱۷)

۴۵ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سلسیوس، تکثیر اولیه هم به مدت ۷۲ ثانیه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و برای تکثیر نهایی هم در مدت زمان ۱ دقیقه از دمای ۷۲ درجه سلسیوس استفاده گردید. همچنین برنامه دمایی ژن *bla_{TEM-1}* به این صورت می‌باشد که، سیکل‌های دمایی برای واسرشتگی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۳ چرخه حرارتی شامل واسرشتگی ثانویه در ۹۴

برای تکثیر ژن‌های مورد مطالعه ترموسایکلر Eppendorf ۵۳۳۱ (ساخت آلمان) مورد استفاده قرار گرفت. برنامه دمایی برای انجام واکنش PCR در ژن‌های *bla_{CTX-1}* و *bla_{SHV}* به صورت زیر می‌باشد: سیکل‌های دمایی برای واسرشتگی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشتگی ثانویه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت

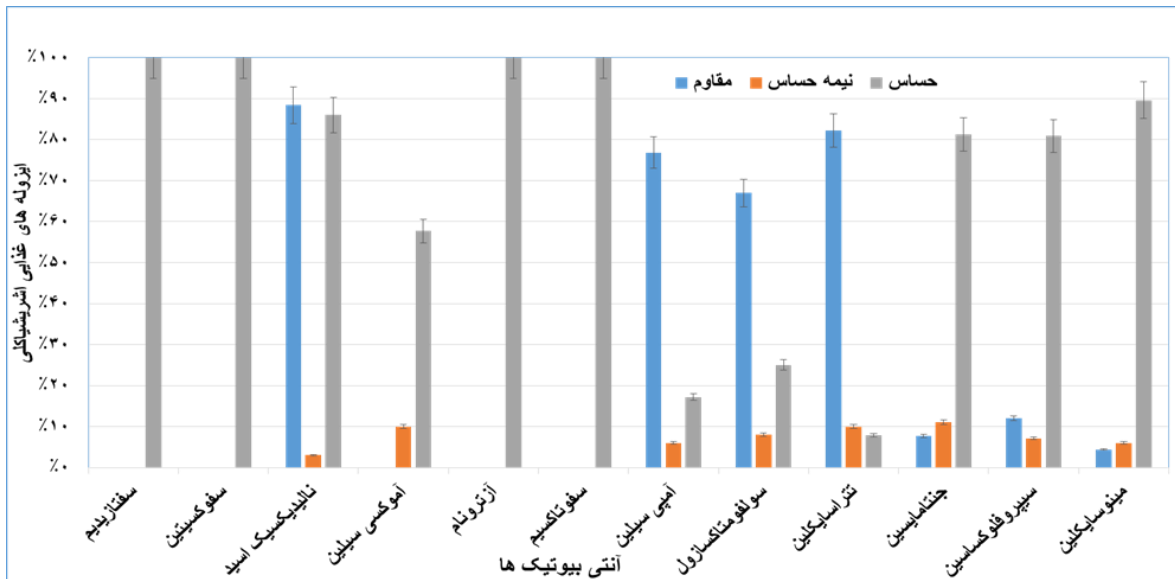
(تعیین فراوانی، درصد و میانگین) و نرم افزار SPSS v.16 (IBM, USA) استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه که تعداد ۹۳ ایزوله /شریشیاکی از نمونه‌های مختلف غذایی جداسازی گردید، فراوانی آن به شرح زیر می باشد: ۱۶ ایزوله (۱۷/۲ درصد) از گوشت قرمز، ۶ ایزوله (۶/۴۵ درصد) از سوسیس، ۶ ایزوله (۶/۴۵ درصد) از کالباس، ۵ ایزوله (۵/۳۷ درصد) از شیرخام، ۱۲ ایزوله (۱۲/۹ درصد) از گوشت مرغ، ۵ ایزوله (۵/۳۷ درصد) از پنیر جداسازی شدند. از این میان بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به نالیدیکسیک اسید (۸۸/۴ درصد)، آمپی سیلین (۷۶/۸ درصد)، و تتراسیکلین (۸۲/۸ درصد)، سولفومتاکسازول (۶۷/۰ درصد) مشاهده شده است. همچنین در این مطالعه مقاومتی نسبت به سفتازیدیم، سفوکستین، آزترونام، سفوتاکسیم مشاهده نشده است (جدول ۲).

درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۵۴ درجه سلسیوس، تکثیر اولیه هم به مدت ۷۲ ثانیه در دمای ۴۵ درجه سلسیوس و برای تکثیر نهایی هم در مدت زمان ۱ دقیقه از دمای ۷۲ درجه سلسیوس محاسبه گردید. در این بررسی به عنوان شاهد از سوش‌های کنترل اشرشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲ و کلبسیلا پنومونیه ATCC ۷۰۰۶۰۳ (دارای آنزیم ESBL) استفاده گردید.

در نهایت ۸ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل اگارز ۲/۵ درصد در بافر $\times 0.5$ الکتروفورز گردید. نتایج اولیه روی ژل با دستگاه ترانس لومیناتور (Syngene انگلیس) مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت نتیجه نهایی توسط دستگاه Gel Documentation بررسی و از آن عکس تهیه شد. از مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز (Thermofisher آمریکا) برای شناسایی باندهای موردنظر استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده از روش‌های آماری توصیفی



نمودار ۱- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های *اشرشیا کلی* جدا شده از مواد غذایی

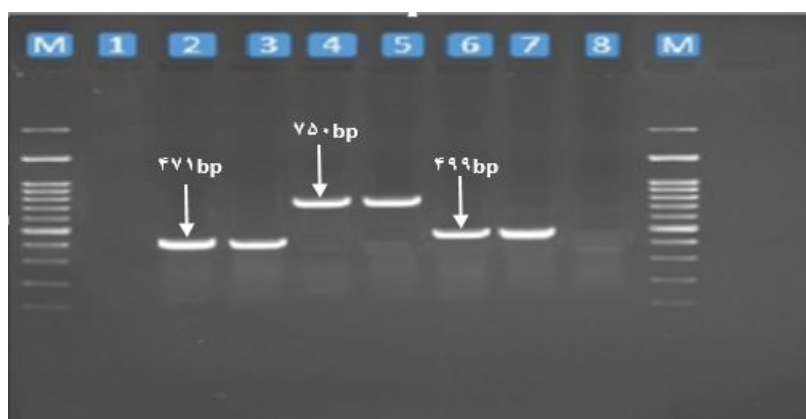


بررسی فنوتیپی تولید ESBLs

ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی/اشریشیاکلی جدا سازی شده از مواد غذایی در برابر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و سفتازیدیم در (نمودار ۱) نشان داده شده است و نتایج حاصل نشان می دهد که همه ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیک ها نامبرده حساس بودند. آزمایشات تأییدی با استفاده از مهار کننده کلاوولانیک اسید (سفتازیدیم- کلاوولانیک اسید و سفوتاکسیم -کلاوولانیک اسید) نشان داد که هیچ کدام از سویه ها آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف نوع ESBLs تولید نکردند.

ارزیابی ژنوتیپی تولید ESBLs *bla_{TEM-1}* (*bla_{CTX-1}*, *bla_{SHV}*)

بررسی تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف به روش PCR انجام شد و نتایج حاصل نشان داد که که میزان فراوانی ژن-های *bla_{SHV}*، *bla_{CTX-1}* و *bla_{TEM-1}* در ایزوله های اشریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی به ترتیب ۵/۳۷، ۱۹/۳۵ و ۲۹/۰۳ درصد گزارش گردید (شکل ۱). ایزوله‌های به دست آمده از نمونه‌های اشریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی نشان داد که گوشت قرمز و گوشت مرغ دارای بیشترین فراوانی از نظر حضور ژن‌های بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) بودند (جدول ۳).



شکل ۱- الکتروفورز تکثیر موفقیت‌آمیز محصولات ژن‌های *bla_{TEM-1}*، *bla_{CTX-1}*، *bla_{SHV}* با طول آمپلیکون ۴۷۱ جفت باز (چاهک شماره ۲ و ۳) برای ژن *bla_{SHV}*، ۴۹۹ جفت باز (چاهک شماره ۶ و ۷) برای ژن *bla_{CTX-1}*، ۷۵۰ جفت باز (چاهک شماره ۴ و ۵) برای ژن *bla_{TEM-1}* بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد و چاهک M مارکر با طول ۱۰۰ جفت باز. از سویه کلبسیلا پنومونیه ATCC ۷۰۰۶۰۳ عنوان سویه کنترل مثبت و از سویه اشریشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان سویه کنترل منفی استفاده شدند.



جدول ۲- نمونه‌های اشریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی

نوع نمونه	تعداد نمونه	تعداد نمونه های آلوده	درصد آلودگی
گوشت قرمز	۲۴	۱۶	۱۷/۲۰
سوسیس	۱۵	۶	۶/۴۵
کالباس	۱۲	۶	۶/۴۵
شیر خام	۸	۵	۵/۳۷
گوشت مرغ	۲۰	۱۲	۱۲/۹
پنیر	۱۴	۵	۵/۳۷
تعداد کل نمونه	۹۳	۵۰	۵۳/۷۶

جدول ۳- فراوانی ژن های ESBLs در جدایه‌های اشریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی

ژن	تعداد ایزوله/اشریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی						تعداد کل ایزوله- های حاوی ژن‌ها
	گوشت قرمز	سوسیس	کالباس	شیر خام	گوشت مرغ	پنیر	
<i>bla_{TEM-1}</i>	۱۱	۵	۳	۲	۳	۳	۲۷
<i>bla_{SHV}</i>	۰	۱	۱	۰	۳	۰	۵
<i>bla_{CTX-1}</i>	۶	۳	۲	۱	۴	۲	۱۸

است منجر به مقاومت در باکتری‌های مختلف شود و درمان عفونت‌های باکتریایی را با مشکل مواجه سازد (۱۹).

در این مطالعه ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های به روش دیسک دیفیوژن مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی-بیوتیکی نسبت به نالیدیکسیک اسید ۸۸/۴ درصد، آمپی سیلین ۷۶/۸ درصد، و تتراسیکلین ۸۲/۸ درصد، سولفومتاکسازول ۶۷/۰ درصد مشاهده شده است. همچنین در این مطالعه مقاومتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتراییدیم، سفوکسیتین، آزترونام، سفوتاکسیم مشاهده نشد.

بررسی نتایج آماری نشان می‌دهد که ارتباط معنی‌داری بین میزان شیوع این ژن‌ها و مقاومت نسبت به همه آنتی-بیوتیک‌ها مشاهده نشد.

بحث

اشریشیاکلی شایع‌ترین گونه بی‌هوازی اختیاری در دستگاه گوارش انسان و حیوانات است که معمولاً یک میکروب بی-ضرر محسوب می‌شود اما همچنان یک باکتری مهم در پزشکی است که موجب بیماری‌های قابل توجهی می‌شود (۱۸). در عصر حاضر، بسیاری از یافته‌ها نشان داده است که انتخاب نامناسب و سوء استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن



همسو با این مطالعه در مطالعه‌ای که توسط ابراهیم^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی ایزوله‌های /شریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی انجام شد، بیشترین مقاومت آنتی-بیوتیکی نسبت به آنتی-بیوتیک‌های آمپی سیلین و سولفانامیدها و کمترین میزان مقاومت آنتی-بیوتیکی نسبت به ایملی پنم و سیپروفلوکساسین گزارش شد (۲۰). همچنین در مطالعه کسابا^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۸ در کانادا بیشترین مقاومت آنتی-بیوتیکی سویه‌های /شریشیاکلی را نسبت به تتراسیکلین (۷۸/۹ درصد) و آمپی سیلین (۳۰/۶ درصد) گزارش دادند (۲۱). در مطالعه آنو^۳ و همکاران در سال ۲۰۱۰ بیشترین مقاومت آنتی-بیوتیکی سویه‌های /شریشیاکلی جدا شده از انسان‌ها و حیوانات را نسبت به تتراسیکلین به میزان (۷۷ درصد) گزارش دادند (۲۲) دلیل وجود میزان بالای مقاومت نسبت به تتراسیکلین و آمپی سیلین در باکتری /شریشیاکلی را می‌توان به استفاده بیش از حد این دو نوع آنتی-بیوتیک در دام‌ها (تتراسیکلین) و انسان (آمپی سیلین) ذکر کرد.

مقاومت آنتی-بیوتیکی در /شریشیاکلی از اهمیت خاصی برخوردار است، زیرا این باکتری شایع‌ترین پاتوژن گرم منفی در انسان می‌باشد و از طرفی شایع‌ترین علت عفونت‌های دستگاه ادراری، باکتری می و اسهال در جامعه و بیمارستان است. به علاوه، سویه‌های مقاوم /شریشیاکلی توانایی انتقال مقاومت آنتی-بیوتیکی را به دیگر باکتری‌های ساکن دستگاه گوارش دارا می‌باشد (۲۳، ۲۴).

در حال حاضر گزارشی مبنی بر حضور ژن مقاومت به کلیستین در ایزوله‌های /شریشیاکلی جدا شده از حیوانات و

انتقال این ژن مقاومت به ایزوله‌های جدا شده از بیماران وجود دارد (۲۵). ژن‌های بتالاكتامازی به ویژه ESBLs، یکی از عوامل مؤثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی-بیوتیک‌های از جمله سفالوسپورین‌ها وسیع الطیف است. ارگاناسم‌هایی که این ژن‌ها را در خود حمل می‌کنند باعث افزایش بیماری‌زایی و مرگ و میر در بین افراد می‌شوند (۲۶).

بررسی تولید بتالاكتامازهای وسیع الطیف به روش PCR بر روی ۹۳ ایزوله /شریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی، انجام شد که بیش از ۵۰ درصد نمونه‌ها تولید کننده آنزیم‌های وسیع الطیف بودند که میزان فراوانی ژن‌های *blaSHV*، *blaCTX-1* و *blaTEM-1* در ایزوله‌های /شریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی به ترتیب ۵/۳۷، ۱۹/۳۵ و ۲۹/۰۳ درصد گزارش شد. در مطالعه‌ای که توسط لانگاتا^۴ و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام گرفت نشان دادند که فراوانی ژن *CTX-M* برابر با ۱۸ درصد می‌باشد که فراوانی ژن *CTX-M* مورد مطالعه ما تقریباً همسو با آن بود. همچنین بیش از ۵۰ درصد نمونه‌های مورد مطالعه آنها تولید کننده آنزیم‌های وسیع الطیف ESBLs بودند، که این گزارش‌ها با نتایج به دست آمده در این مطالعه کاملاً همخوانی داشت (۲۷). همچنین در مطالعه دیگری که توسط میر و همکارانش در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت نشان دادند که فراوانی باسیل های /شریشیاکلی مولد ESBL در ICU های کشور آلمان از ۱۴ درصد در سال ۲۰۰۱ به ۵۲/۱ درصد در سال ۲۰۰۷ رسید (۲۸).

در مطالعه حسن نژاد و همکاران که موفق شدند ۶۰ ایزوله /شریشیاکلی را از نمونه‌های مدفوعی طیور جداسازی کنند.

^۱Ibrahim^۲Casaba^۳Unno^۴Langata LM^۵Meyer



بسیار ضروری می‌باشد. علاوه بر این، با شناسایی به موقع و دقیق سویه‌های بیماری‌زا، و درمان قطعی عفونت‌های ناشی از آنها، می‌توان از گسترش و انتشار بین گونه‌ای این ژن‌های عوامل بیماری‌زایی نیز جلوگیری کرد.

نتیجه‌گیری

بررسی نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ایزوله‌های اشریشیاکلی جدا شده از مواد غذایی مقاومت نسبتاً بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پر مصرف نظیر آمپی‌سیلین، سولفومتاکسازول و تتراسایکلین از خود نشان دادند و از سویی دیگر مقایسه بین نتایج تست‌های فنوتیپی و ژنوتیپی برای تشخیص ESBLs ها نشان می‌دهد که حساسیت، دقت و اختصاصیت روش PCR بیشتر از روش فنوتیپی است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح مصوب با کد ۹۶۰۳۰۲۱۴۳۴ شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان می‌باشد. بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان و همچنین مسئولین محترم آزمایشگاه میکروبی شناسی که در اجرای این طرح ما را یاری کردند، قدردانی می‌شود.

بررسی وجود ژن‌های *bla_{TEM}*، *bla_{CTX-M}* و *bla_{SHV}* در نمونه‌های اشریشیاکلی جدا شده از طیور به روش PCR نشان داد که ۴۱ (۶۸/۳ درصد) ایزوله دارای ژن *bla_{CTX-M}*، ۲۸ (۴۶/۶ درصد) دارای ژن *bla_{SHV}* و *bla_{CTX-M}* در هیچکدام از نمونه‌ها یافت نشد (۲۶). این نتایج با مطالعه حاضر مغایرت دارد و از دلایل آن می‌توان به فراوانی بیشتر ژن‌های *bla_{TEM}* و *bla_{SHV}* در خارج از کشور نسبت به داخل دانست. در مطالعه دیگری که توسط قنبرپور و همکارانش در سال ۲۰۱۲ انجام گرفت، ۱۰۰ ایزوله باکتری اشریشیاکلی از پریکارد جوجه‌های گوشتی در استان ایلام جداسازی شد و با استفاده از ویژگی‌های بیوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفت. ایزوله‌ها از نظر حضور ژن‌های بتالاكتاماز (*bla_{TEM}* و *bla_{SHV}*) به روش PCR بررسی شدند که ده ایزوله (۱۰ درصد) واجد ژن *bla_{TEM}* بود که از نتیجه حاصل شده در مطالعه ما پایین‌تر بود و دو ایزوله (۲ درصد) واجد ژن *bla_{SHV}* بود که در این مطالعه ۵/۳۷ درصد گزارش شده است (۲۹). در مطالعه هوا^۱ و همکاران در طی سال‌های ۲۰۰۱-۲۰۰۶ در سوئد نشان داده شد که از میان ۸۷ ایزوله اشریشیاکلی جدا شده از طیور که از لحاظ فنوتیپی به عنوان مولدین ESBLs شناخته شده بودند، ۶۳ درصد ژنوتیپ *bla_{TEM}* بتالاكتاماز را دارا بودند (۳۰). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که همچون سایر مطالعات انجام شده در داخل و خارج کشور فراوانی ژن مقاومت *bla_{SHV}* در ایران کم می‌باشد و فراوانی ژن‌های مقاومت *bla_{TEM}* و *bla_{TEM}* بیشتر می‌باشد.

تهاجم برخی سویه‌های اشریشیاکلی از نظر تولید فاکتورهای بیماری‌زا می‌تواند در نتیجه استفاده نا به جا و کنترل نشده آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف باشد. ازاین رو، با در نظر گرفتن نقش مؤثر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این زمینه، نقش نظارت جدی‌تر بر مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مختلف،

^۱Ho



References

1. Davis GS, Waits K, Nordstrom L, Grande H, Weaver B, Papp K, et al. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. BMC microbiology 2018;18(1):174.
2. Babypadmini S, Appalaraju B. Extended spectrum-lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*-prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital. Indian J Med Microbiol 2004;22(3):172.
3. Hmiedan MA. Expression of CTX-M extended spectrum Beta-lactamases by *Escherichia coli* and susceptibility to antimicrobial agents [Dissertation]. Palestine: Birzeit University; April 2010.
4. Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ, et al. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. Emerg Infect Dis 2012;18(5):741-9.
5. Martins FH, Guth BE, Piazza RM, Elias WP, Leao SC, Marzoa J, et al. Lambs are an important source of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in southern Brazil. Vet Microbiol 2016;196:72-7.
6. Cryz Jr S, Fürer E, Germanier R. Safety and immunogenicity of *Klebsiella pneumoniae* K1 capsular polysaccharide vaccine in humans. J Infect Dis 1985;151(4):665-71.
7. Perilli M, Celenza G, De Santis F, Pellegrini C, Forcella C, Rossolini GM, et al. E240V substitution increases catalytic efficiency toward ceftazidime in a new natural TEM-type extended-spectrum β -lactamase, TEM-149, from *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2008;52(3):915-9.
8. Thenmozhi S, Moorthy K, Sureshkumar B, Suresh M. Antibiotic resistance mechanism of ESBL producing Enterobacteriaceae in clinical field: a review. Int J Pure Appl Biosci 2014;2(3):207-26.
9. Overdevest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, et al. Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. Emerg Infect Dis 2011;17(7):1216-22.
10. Paterson D, Egea P, Pascual A, López-Cerero L, Navarro M, Adams-Haduch J, et al. Extended-spectrum and CMY-type β -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. Clin Microbiol Infect 2010;16(1):33-8.
11. Warren R, Ensor V, O'Neill P, Butler V, Taylor J, Nye K, et al. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother 2008;61(3):504-8.
12. Tham J, Odenholt I, Walder M, Brolund A, Ahl J, Melander E. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in patients with travellers' diarrhoea. Scand J Infect Dis 2010;42(4):275-80.
13. Leverstein-van Hall M, Dierikx C, Cohen Stuart J, Voets G, Van Den Munckhof M, van Essen-Zandbergen A, et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. Clin Microbiol Infect 2011;17(6):873-80.
14. Bhat MA, Sageerabanoo S, Kowsalya R, Sarkar G. The occurrence of CTX-M3 type extended spectrum beta lactamases among *Escherichia coli* causing urinary tract infections in a tertiary care hospital in puducherry. J Clin Diagn Res 2012;6(7):1203-6.
15. Randall L, Clouting C, Horton R, Coldham N, Wu G, Clifton-Hadley F, et al. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum β -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. J Antimicrob Chemother 2011 Jan;66(1):86-95..
16. Geyer CN, Hanson ND. Rapid PCR amplification protocols decrease the turn-around time for detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative pathogens. Diagn Microbiol Infect Dis 2013;77(2):113-7.
17. Zaniani FR, Meshkat Z, Nasab MN, Khaje-Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, et al. The prevalence of TEM and SHV genes among extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Iran J Basic Med Sci 2012;15(1):654.
18. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al. Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. Ann Intern Med 2002;137(10):791-7.
19. Pourmand A, Mazer-Amirshahi M, Jasani G, May L. Emerging trends in antibiotic resistance: implications for emergency medicine. Am J Emerg Med 2017;35(8):1172-6.



20. Ibrahim DR, Dodd CE, Stekel DJ, Ramsden SJ, Hobman JL. Multidrug resistant, extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from a dairy farm. FEMS Microbiol Ecol 2016;92(4):fiw013.
21. Varga C, Rajic A, McFall ME, Avery BP, Reid-Smith RJ, Deckert A, *et al.* Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolated from swine fecal samples in 90 Alberta finishing farms. Can J Vet Res 2008;72(2):175-80.
22. Unno T, Han D, Jang J, Lee S-N, Kim JH, Ko G, *et al.* High diversity and abundance of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and farm animal hosts in Jeonnam Province, South Korea. Sci Total Environ 2010;408(17):3499-506.
23. Österblad M, Hakanen A, Manninen R, Leistevuo T, Peltonen R, Meurman O, *et al.* A between-species comparison of antimicrobial resistance in enterobacteria in fecal flora. Antimicrob Agents Chemother 2000;44(6):1479-84.
24. Rasheed MU, Thajuddin N, Ahamed P, Teklemariam Z, Jamil K. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2014;56(4):341-6.
25. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 2016;16(2):161-8.
26. Hasannejad R, Ghanbarpour R, Amini K, Nasr J. Detection of bla TEM, bla CTX-M and bla SHV in *Escherichia coli* isolated from poultry by multiplex-PCR and determination of the strains susceptibility profile in Kerman province. Veterinary Researches & Biological Products 2017;29(4):25-30. [Persian]
27. Langata LM, Maingi JM, Musonye HA, Kiiru J, Nyamache AK. Antimicrobial resistance genes in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from chicken droppings in Nairobi, Kenya. BMC Res Notes 2019;12(1):22.
28. Meyer E, Gastmeier P, Schwab F. The burden of multiresistant bacteria in German intensive care units. J Antimicrob Chemother 2008;62(6):1474-6.
29. Ali Asadi S, Dastmalchi Saie H, Hoseini SSH. [Identification of broad-spectrum beta-lactamase genes (ESBLs) belonging to b-laCTX-M, blaTEM and blaSHV groups in E.coli derived from poultry faecal specimens in Urmia region]. Journal of Veterinary Laboratory Research 2012;4(1):90-1. [Persian]
30. Ho P-L, Wong R, Chow K-H, Yip K, Wong S, Que T-L. CTX-M type beta-lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. J Microbiol Immunol Infect 2008;41(5):428-32.



The phenotypic and molecular analysis of the production of broad-spectrum beta-lactamases (ESBLs) among strains of *Escherichia coli* isolated from food in Hamedan

Hadi Hossinpour¹, Hamid Motamedi¹, Ali Mohammadi Bardbori², Rasoul Yousefi Mashouf^{*1}

1- Department of Microbiology, School of Medicine, University of Hamedan, Hamedan, Iran

2- Department of Microbiology, School of Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

Original Article

Received: Feb 12, 2019

Accepted: Mar 10, 2019

***Corresponding Author:**

Rasoul Yousefi Mashouf,
Department of Microbiology,
School of Medicine,
University of Hamedan,
Hamedan, Iran

TEL:

Email:

Yousefimash@gmail.com

ABSTRACT

Introduction

One of the reasons for drug resistance in *Escherichia coli* isolates is the production of broad-spectrum beta-lactamases. The widespread use of antibiotics in the agricultural and dairy industry has led to raising antibiotic resistance. Therefore, the aim of this study was to investigate the phenotypic and molecular ESBLs production among *E. coli* isolated from food.

Materials and Methods

This descriptive cross-sectional study was carried out by 93 *E. coli* isolated from food and poultry in Hamadan in 2017. Then, the microbial susceptibility of the beta-lactamase producing isolates was determined using the (Combined test CT) method and according to CLSI (2015) guidelines. Also, molecular identification of genes producing ESBLs (*bla_{SHV}*, *bla_{CTX-1}*, and *bla_{TEM-1}*) was performed by PCR method.

Results

Evaluation of microbial susceptibility showed that the highest antibiotic resistance was observed for nalidixic acid (%88.4), ampicillin (%76.8), tetracycline (%82.8), and sulfamethoxazole (%67). Resistance to ceftazidime, Cefoxitin, aztreonam, cefotaxime was not observed in this study. The genotypic study by PCR method showed that the frequency of *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-1}*, and *bla_{TEM-1}* genes in *E. coli* isolated from food (%5.37), (%19.35) and (%29.03), respectively.

Conclusion

E. coli isolated from food showed high resistance to antibiotics such as ampicillin, sulfamethoxazole, and tetracycline. On the other hand, the PCR method is more sensitive than the culture method.

Keywords

Escherichia coli, broad-spectrum beta-lactamase (ESBLs), PCR

► **Please cite this article as:** Hossinpour H, Motamedi H, Mohammadi Bardbori A, Yousefi Mashouf R. The phenotypic and molecular analysis of the production of broad-spectrum beta-lactamases (ESBLs) among strains of *Escherichia coli* isolated from food in Hamedan. Neyshabur Univ Med Sci 2019;7(1):70-81.